

(19) THE JAPANESE PATENT OFFICE (JP)  
(12) LAID-OPEN PATENT APPLICATION (A)  
JP 2- 268682

(43) Publication date : November 2, 1990 (H.2)

(51) Int. Cl <sup>5</sup>	Identification No.	Office . class. No.
C 12 N 15/10 //C 07 H 21/04 15/00 A	Z	7822- 4C 8717- 4B C 12N

Number of claims : 5  
Number of pages : 6  
Examination : Not requested

---

(54) [Title of the Invention]

Method of Preparing the DNA Specimen  
(21) Application No. : 1- 86806  
(22) Dated : April 4, 1989 (H1)

(72) Inventors : M. Fujita et al.

(71) Applicant : Hitachi Co. Ltd.  
6, 4-chome, Kandashungadai  
Chiyoda-ku, Tokyo

(74) Representative attorney : K. Ogawa

## SPECIFICATIONS

### 1. Name of the Invention

Method of preparing the DNA specimen

### 2. Scope Covered in the Invention

We claim :

1. A method of preparing the DNA specimen. The method is characterized in that in the fabrication of the DNA specimen by mixing a DNA specimen-contained water solution and a reagent in a container and by making them react together, a substance to be absorbed on a wall of the container without damaging the reaction system is added and react;

2. The method of preparing the DNA specimen as set forth in claim (1) is characterized in that DNA without damaging the reaction system is added ;

3. The method of preparing the DNA specimen as set forth in claim (1) is characterized in that a non-ionic surfactant is used;

4. The method of preparing the DNA specimen as set forth in claim (3) is characterized in that said method employs polyoxyethylene sorbitan monolaurate;

5. In the method of preparing the DNA specimen as set forth in claim (1), instead of pouring a substance to be absorbed on a wall of the contained without damaging the reaction system, a substance for the adhesion to the container is introduced before the reaction takes place and said substance is absorbed to the wall of said container.

### 3. Detailed Description of the Invention (Field of Applications)

This invention is related to a method of preparing a DNA specimen. In particular, this invention is related to a desirable method where DNA has a good reaction efficiency in an automatic apparatus.

#### (Prior Art)

Let take the process of determining the base configuration as an example of the conventional methods. As has been discussed in the M13 sequence kits' manual instruction of Tama Sakezukuri Co., Ltd. (1966), in this method, a casting -type? (illegible) DNA of pmole order, a primer of the same amount, a buffer and distilled water are mixed. The mixture is then heated to 60 C and the primer annealing reaction is proceeded. Afterwards, DNA polymerase and dNTP, ddNTP are added to the above mixed solution. And the phase - assisting - chain - synthesis reaction is carried out. That is, a special effort has not been made to eliminating the adhesion of the DNA specimen.

#### (Problems to Be Solved)

In the conventional method, when the DNA content is small, DNA is absorbed on the reaction container, resulting in a reduction in the reaction rate. When the reaction container is low cost, light and easy to handle and the DNA content is sufficient, the absorbed amount of DNA is at a negligible level; and as a result, the container made out of plastic such as polypropylene is used. However, when the absolute amount of DNA is small, the reaction rate would be reduced due to the DNA absorption to the plastic wall. Results of the study of the above-mentioned reaction rate in the base configuration determination process can be shown as follows.

Fig. 3 shows a comparison of the spectra of the fragment of the casting -type DNA 0.5 pmole (Fig. b) at the standard conditions and at half DNA content, i.e. 0.25 pmole (fig. a). In these figures, the horizontal axes denote the electrical moving time, the vertical axes indicate the relative value of the fluorescent intensity. The numbers in the figures show the base length of the DNA fragments. When the amount of the casting-type DNA is made in half, S/N of the peak showing the DNA fragment will be, by average, reduced to a level of 20% for 0.5 pmole of DNA and measurement of the reaction

peak will become difficult.

Fig. 4 is for the summary showing the above-mentioned direction of the the reaction rate. In this figure, the horizontal axis shows the content of DNA provided, whereas the vertical axis indicates ratio of the reaction rate (here, referred to as the relative reaction rate); and the reaction rate of the casting -type DNA 0.4 pmole is made 1. When content of the casting -type DNA is larger than 0.4 pmole, the reaction rate will be increased slowly. On the other hand, when the DNA content is less than 0.4 pmole, effect of the DNA absorption phenomenon will become strong, resulting in an abrupt reduction in the reaction rate. Here, the base configuration determination process is taken as an example. In the DNA reaction, however, all the DNA absorption will cause problems. Furthermore, the fabrication process for the DNA specimen will create a lot of burdens on the operator. Therefore, there is an increased demand on the automation by means of the automatic apparatus. Accordingly, even in the method of eliminating the absorption, the method which is easily amenable to the automation is required.

This invention provides a method where the DNA absorption amount is reduced, the DNA content is effectively made into reaction and can be easily adapted to the automatic apparatus.

#### (Procedures to Solve the Problems)

In order to achieve the above-mentioned objective, this invention provides a method whereby a substance to be absorbed to the container without damaging the reaction system is employed. For this substance, DNA without causing damage to the reaction system or non-ionic surfactant which is polyoxyethylene sorbitan monolaurate is employed.

In order to achieve the above-mentioned objective, one employs the method whereby the substance to be absorbed to the container is poured in advance to the container before the reaction is taken place and the substance is absorbed to the wall of the container.

### (Operation)

There is an upper limit for the number of molecules to be absorbed to the wall of the container. By making the molecule number of the above-mentioned substance to be absorbed being sufficiently larger than the molecular number of DNA, the substance other than DNA is absorbed to the wall of the container. Accordingly, the amount of the DNA specimen to be absorbed to the wall of the container would be reduced, resulting in an increase in the reaction rate. In the method described in this invention, with the addition of the absorbed substance, the automation would be easy.

Before the reaction, the substance to be absorbed to the wall of the container is poured in advance into the container and the above-mentioned solution acts as a reagent once the absorption is well done and the reaction is taken place. In this method, there is not room for the DNA to be absorbed to the wall of the container before the reaction and the reaction rate would be enhanced and the automation would be easy. Furthermore, according to this method, if the above-mentioned solution is thoroughly removed and possibility of the contamination is reduced, even if there were damage to the reaction system due to the substance to be absorbed to the wall of the container, the advantage would be that this no problems would be resulted.

### (Examples)

The flow chart in Fig. 1 is used to describe the base configuration determination process of the method of preparing the DNA specimen in this invention. According to the method in the example, a casting-type DNA, a primer of the same molecule number as the DNA, a buffer and the distilled water for adjusting the reaction amount are added (step 1). With the a configuration which is different from the casting-type DNA, damage to the reaction will not occur, and another type of DNA as a substance to be absorbed to the wall of the container is poured into the container (step 2). The incubation is done at a temperature range of 55-60 C

(step 3). The container is then cooled down to the level of ambient temperature (step 4). Then DNA polymerase is added (step 5). An equal amount of the reaction liquid is added (step 6), followed by the introduction of a stopping agent of the DNA chains (step 7). The incubation is done by increasing the temperature from the ambient temperature level to 37 C (step 8), then a Chase ? (Chleisu?) mixed liquid is introduced (step 9), followed by the incubation similar to step (8) (step 10). Finally, a stopping agent such as polyamide is added (step 11).

The experimental results of this method are shown in Fig. 5.

In this example, the primer is coated with fluorescence and the fluorescent light is used, the light emitted from the DNA fragments is detected.

Fig. (b) shows the spectra of the DNA fragments in the case where the casting-type DNA content is 0.25 pmole and other DNA types are not introduced. Fig. (a) shows the spectra of the DNA fragments for the case whereby the molecule number of the primer being DNA other than the casting -type DNA is added with one order of magnitude higher than the casting-type DNA. In these figures, the horizontal axes show the time and the vertical axes denote the fluorescent intensity, the number show the base length in the DNA fragment. With the excess content of DNA, the absorbed amount of the casting-type DNA to the wall of the container would be reduced and it is clear that the reaction rate would be increased.

The second example of the method of preparing the DNA specimen in this invention is summarized in the flowchart in Fig. 2. The basic flow is similar to the one in the first example. The adding of other types of DNA in step 2 is substituted with the non-ionic surfactant as an absorbing agent to the wall of the container, such as polyoxyethylene (20) sorbitan monolaurate, as shown in step 12.

The experimental results of this example are summarized in Fig. 6. Fig. (b) shows spectra of the DNA fragments for the case whereby the reaction is taken place at the absence of the polyoxyethylene (20) sorbitan monolaurate. The upper side of the figure shows the spectra of the DNA fragments in the case

whereby polyoxyethylene (20) sorbitan monolaurate is introduced in such a way that its amount would be 0.1 % in the annealing reaction liquid. Also here, the primer and the casting-type DNA are provided at the same amount. With the polyoxyethylene (20) sorbitan monolaurate, the absorbed amount of the casting-type DNA to the wall of the container is reduced, resulting in an increase in the reaction rate.

In the first example and the second example, the absorbed substance is poured into the container after the reaction liquid is prepared. It would be possible to add in advance said absorbed substance to the distilled water and the buffer.

The third example of the method of preparing the DNA specimen of this invention is summarized in the flow chart of Fig. 7. The reaction liquid is poured into the container, before step 1, a substance to be absorbed to the wall of the container is poured (step 13), and the above solution is removed and dried as shown in step 14. For the absorbed substance, pBR 2 chains DNA and polyoxyethylene (20) sorbitan monolaurate are used.

Spectra of the DNA fragments of S/N being the same level as the ones shown in Figs 5 and 6 are obtained.

The above method can also be used for the reaction of other DNA specimen, for example the controlled oxygen decomposition reaction.

#### (Effect of the Invention)

In this invention, one is able to eliminate the absorption of the DNA specimen to the wall of the container. Particularly, when the DNA content is small, the reaction rate would be increased.

#### 4. Brief Description of the Invention

Figs. 1, 2 and 7 show the flowchart of the process in the examples described in this invention. Fig. 3 shows the variation of the spectra of the DNA fragments in the base configuration

Hitachi Co., Ltd.

JP 2-268682

Page 8

---

determination process of the conventional method. Fig4 is the graph which shows the trend obtained in Fig. 3. Figs 5, 6 shows the spectra of the DNA fragments of the example and the conventional example, respectively.



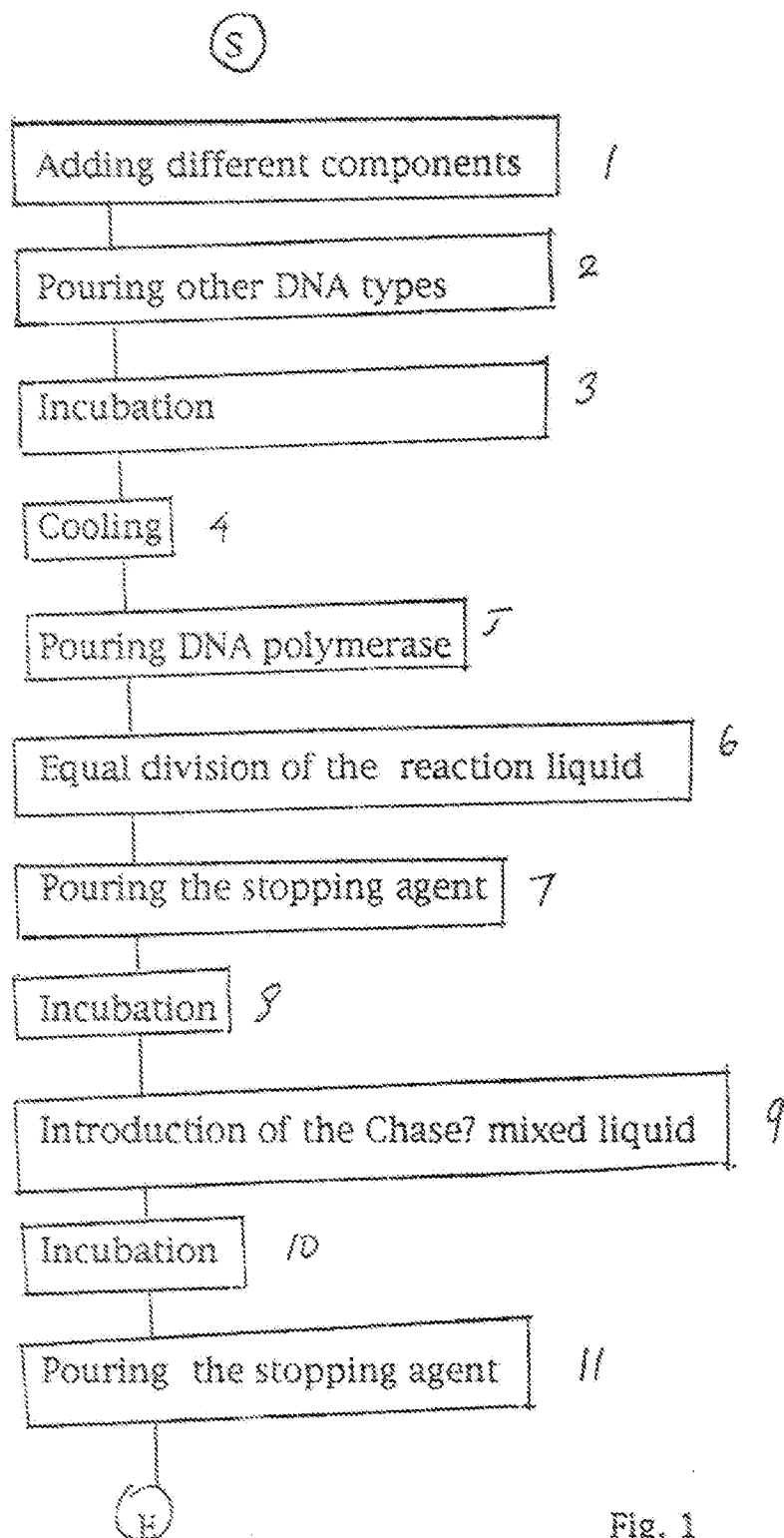


Fig. 1

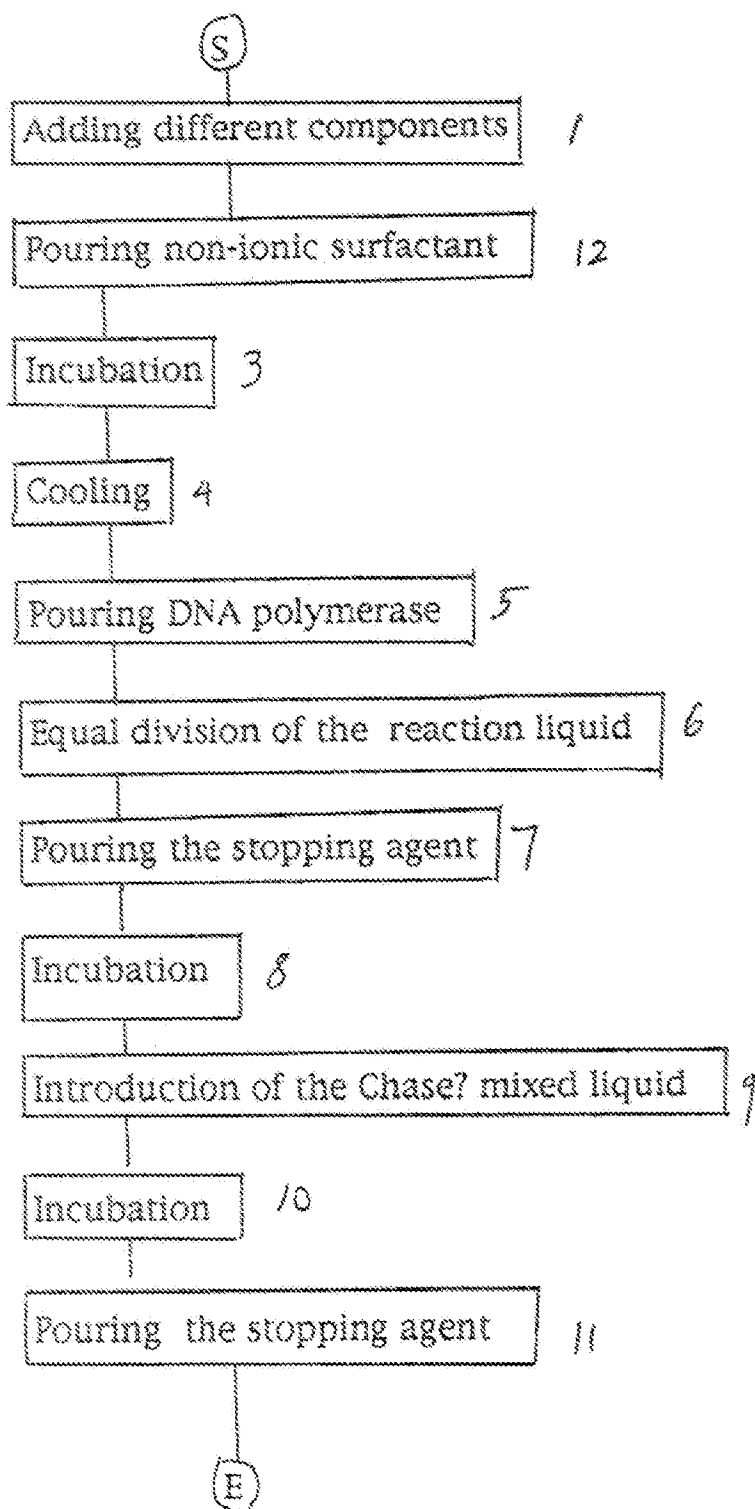


Fig.2

2-268682

10

Fig. 3

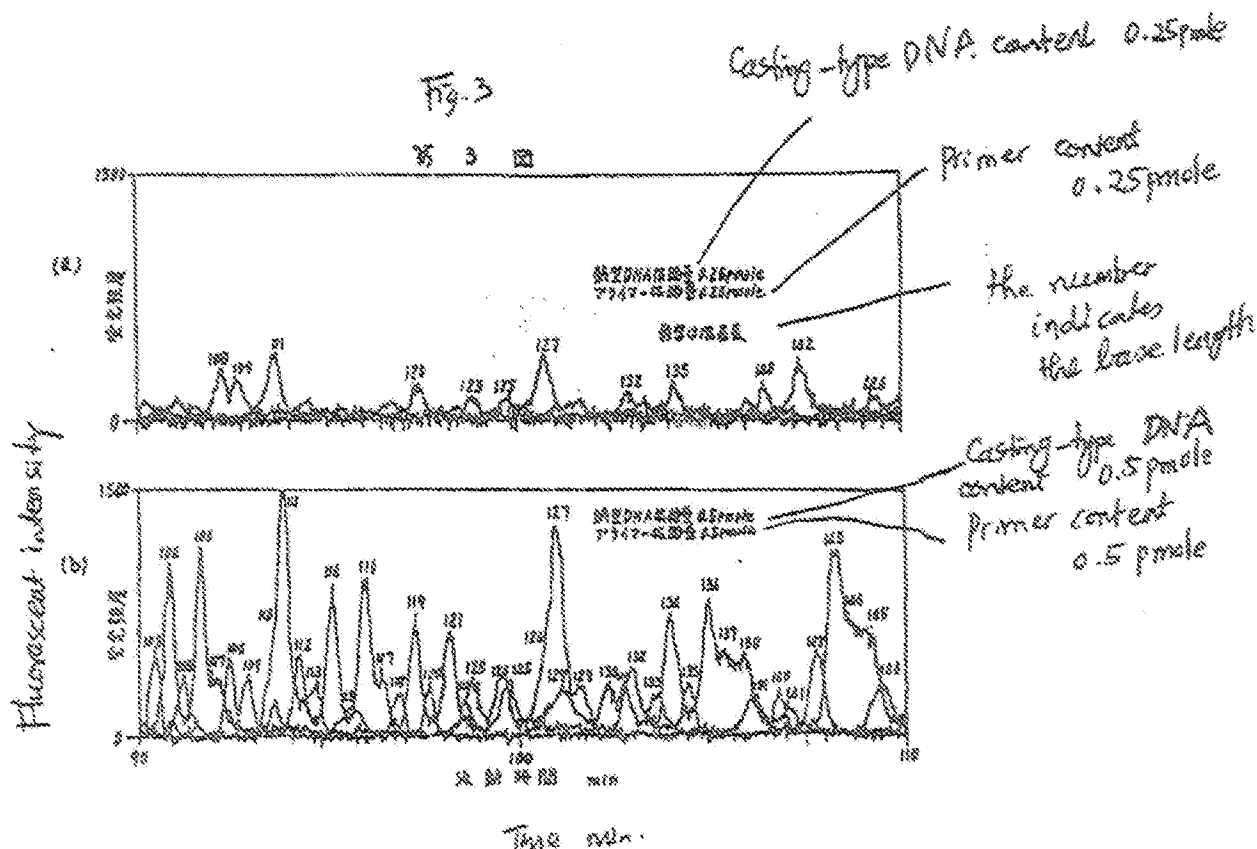
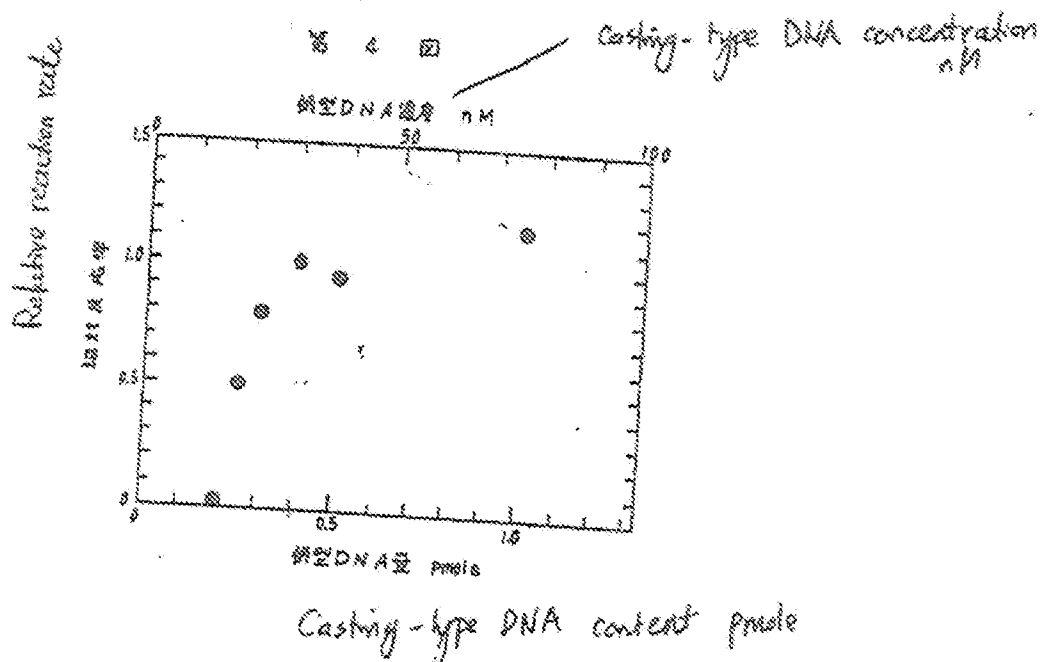


Fig. 4



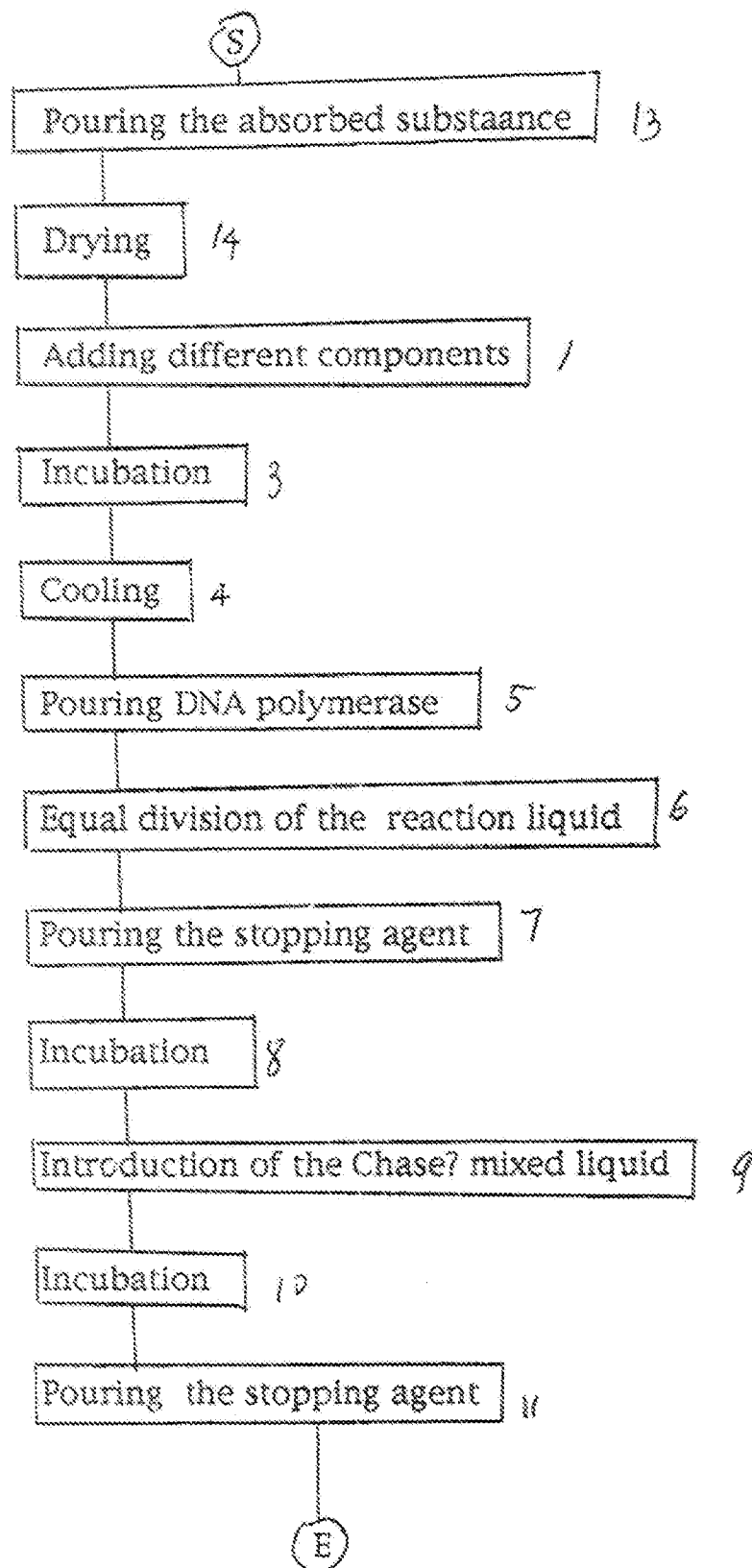


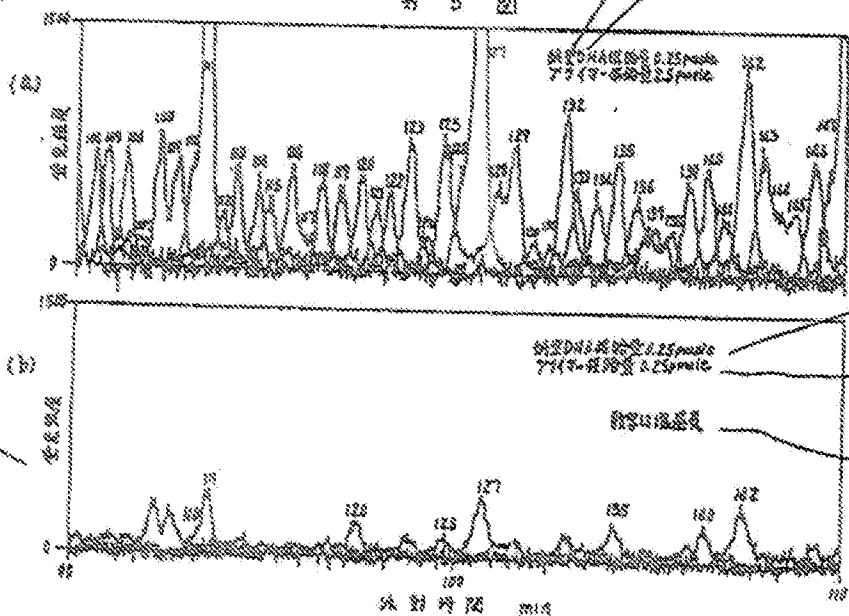
Fig. 7

Fig. 5

Casting-type DNA Content 0.25 pmole

Primer content 2.5 pmole

Fluorescent intensity



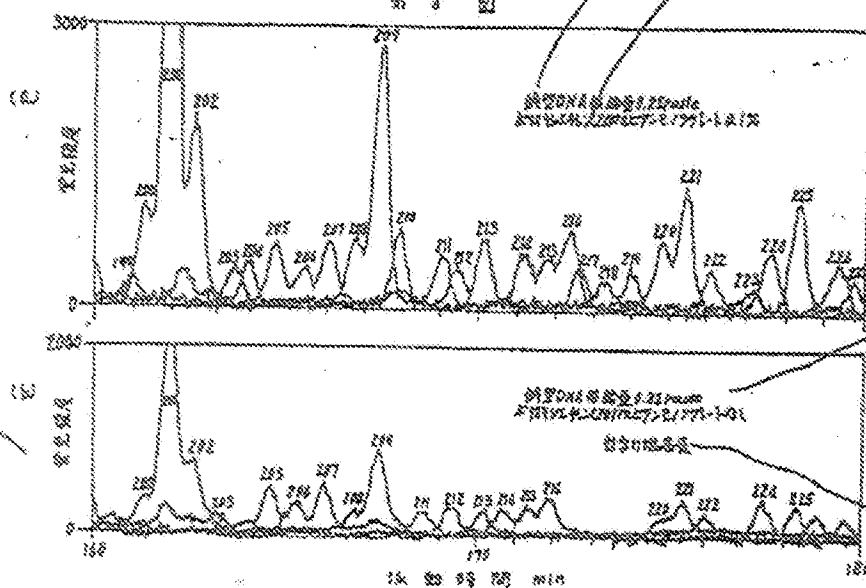
Time min.

Casting-type DNA content  
0.25 pmolePrimer content  
0.25 pmoleNumber indicates  
the base length

Fig. 6

Casting-type DNA content  
polyoxyethylene(20)  
sorbitan monoborate  
0.1%

Fluorescent intensity



Time min.

Casting-type DNA  
Content 0.25 pmole  
w/o polyoxyethylene  
(20) sorbitan  
monoborateThe number  
indicates  
the base  
length

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A) 平2-268682

⑬ Int.Cl.<sup>5</sup>

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 平成2年(1990)11月2日

C 12 N 15/10  
// C 07 H 21/04

Z

7822-4C  
8717-4B

C 12 N 15/00

A

審査請求 未請求 請求項の数 5 (全6頁)

⑮ 発明の名称 DNA試料調製方法

⑯ 特 願 平1-86806

⑰ 出 願 平1(1989)4月7日

⑱ 発 明 者 藤 田 雅 彦 東京都国分寺市東恋ヶ窪1丁目280番地 株式会社日立製作所基礎研究所内  
⑱ 発 明 者 神 原 秀 記 東京都国分寺市東恋ヶ窪1丁目280番地 株式会社日立製作所基礎研究所内  
⑱ 発 明 者 村 川 克 二 東京都国分寺市東恋ヶ窪1丁目280番地 株式会社日立製作所中央研究所内  
⑲ 出 願 人 株式会社日立製作所 東京都千代田区神田駿河台4丁目6番地  
⑳ 代 理 人 弁理士 小川 勝男 外1名

明 細 書

1. 発明の名称

DNA試料調製方法

2. 特許請求の範囲

1. 容器内でDNA試料水溶液と試薬を混合して反応させるDNA試料調製方法において、反応系を阻害せず容器壁に吸着する物質を注入して反応させることを特徴とするDNA試料調製方法。
2. 反応系を阻害しないDNAを注入することを特徴とする請求項1記載のDNA試料調製方法。
3. 非イオン性界面活性剤を注入することを特徴とする請求項1記載のDNA試料調製方法。
4. ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレートを用いることを特徴とする請求項3記載のDNA試料調製方法。
5. 請求項1記載のDNA試料調製方法において、反応系を阻害せず容器壁に吸着する物質を注入する替わりに、反応に用いる前に導管に吸着する物質を注入して容器壁に該物質を吸着させておくことを特徴とするDNA試料調製方法。

おくことを特徴とするDNA試料調製方法。

3. 発明の詳細な説明

〔産業上の利用分野〕

本発明はDNA試料調製方法に係り、特に微量DNAを自動装置において効率良く反応させるのに好適な方法に関する。

〔従来の技術〕

従来の方法は、塩基配列決定プロセスを例にとると、宝酒造株式会社の特開第1313号（1986年）に記載されているようにピエモント（pilot）オーダの鋳造DNA、等モル量のプライマー、パフア、蒸留水を混合して60℃程度に加温してプライマーアニール反応を進め、前記溶液にDNAポリメラーゼとdNTP・ddNTPの混合液を加えて相補鎖合成反応を行ってきた。すなわちDNA試料の吸着防止のための工夫は特になされてなかった。

〔発明が解決しようとする課題〕

従来法においてはDNA量が少なくなつたときに反応容器にDNAが吸着され反応率が低下する

という問題があった。反応容器としては、安価で吸着しやすく、またDNA量が充分あるときはその吸着量は無視できる程度であるという理由からポリプロピレン等のプラスチック製のものが用いられている。しかしDNAの絶対量が少なくなるとプラスチック製へのDNA吸着の影響が現れて反応率が低下する。塩基配列決定プロセスにおける前記反応率の検討結果を次に示す。

第3図は標準的な条件である錳型DNA 0.5 pmole(図b)とその半分の0.25 pmole(図a)についてのDNA断片スペクトルの比較を示したもので、両図の横軸は電気泳動時間、縦軸は蛍光強度の相対値、図中の数字はDNA断片の塩基長を示す。錳型DNA量を半分にするとDNA断片を示すピークのS/Nは平均して0.5 pmoleの錳型を供給したときの20%程度にまで低下して、反応ピークの測定が困難になった。

第4図は前記の傾向を反応率を指標にしてまとめたもので、図の横軸は錳型DNA供給量、縦軸は反応率の比(ここでは相対反応率と呼ぶ)で、

を阻害しないDNA、あるいは非イオン性界面活性剤であるポリオキシエチレンソルビタンモノラウレートを採用した。

また、上記目的を達成するために、容器壁に吸着する物質を反応前の容器に予め注入して、容器壁に前記物質を吸着させる方法を採用した。

#### 〔作用〕

容器壁に吸着しうる分子数には上限があり、前記吸着物質の分子数をDNAの分子数に対して充分大きくすれば、容器壁には試料とするDNA以外の物質が吸着することになり、試料とするDNAの容器壁への吸着量を低減でき、反応率を向上させることができる。本発明の方法は吸着物質を注入する操作が加わるだけであるので、自動化も容易である。

また反応前の容器に予め容器壁に吸着する物質を注入して、充分吸着した後に前記溶液を廃棄して、反応を行う方法については、反応前の容器壁にDNAが吸着する余地が殺されていないので同様に反応率を向上でき、自動化は容易である。な

錳型DNA 0.4 pmoleの反応率を1とした。0.4 pmoleよりも錳型DNA量が多くなると反応率は穏やかに上昇するが、0.4 pmoleよりも錳型DNA量が少なくなるとDNAの吸着阻害の影響が強くなって反応率は急激に低下する。ここでは塩基配列決定プロセスを例に述べたが、DNA吸着は微量DNAを反応する場合すべてについて問題になる。なおDNA試料調製プロセスは操作者にとり、負担が重く、自動化の要望が強く、今後自動化が進展すると予想される。したがって吸着防止法においても、自動化し易い方法を採用する必要がある。

本発明はDNA吸着量を低減して微量DNAを効率良く反応させるのに最適で、かつ自動装置において容易に実施できる方法を提供することにある。

#### 〔課題を解決するための手段〕

本発明においては、上記目的を達成するために、反応系を阻害せず容器壁に吸着する物質を注入する方法を採用した。注入する物質としては反応系

におも方法によると、前記溶液を充分除去してコンタミネーションの可能性を低くしておけば、容器壁に吸着する物質には反応系を阻害する性質があっても問題にならないという利点がある。

#### 〔実施例〕

本発明によるDNA試料調製方法の塩基配列決定プロセスにおける第一の実施例を第1図のフローチャートを用いて説明する。本実施例の方法は、錳型DNA、錳型DNAと等しい分子数のプライマー、バッファ、反応液量を調整する蒸留水を注入混合する分注(操作1)、錳型DNAと異なる配列で反応を阻害せず、容器壁への吸着剤として用いるDNAを注入する他種DNA注入(操作2)、55〜60℃の温度範囲でのインキュベーション(操作3)、容器を室温レベルにまで冷却する(操作4)、DNAポリメラーゼの注入(操作5)、反応液の等分(操作6)、DNA鎖の伸長・停止剤の注入(操作7)、室温レベルから37℃の温度範囲でのインキュベーション(操作8)、チエイス阻液の注入(操作9)、操作8と同様のイン

キユベーション（操作10）、ホルムアミド等の停止剤の注入（操作11）よりなる。

本方法による実験結果を図5図に示す。

本実施例ではプライマーを蛍光標識し、励起光を用いてDNA断片を蛍光させ、その蛍光を検出した。

図（b）は鎖型DNA供給量を0.25 pmolsと微量にし、他種DNAを注入しないときのDNA断片スペクトルであり、図（a）は鎖型以外のDNAとしてプライマーの分子数を鎖型DNAの分子数より一桁多く注入したときのDNA断片スペクトルである。図の横軸は泳動時間、縦軸は蛍光強度、数字はDNA断片の塩基長である。過剰に注入されたDNAにより容器壁への鎖型DNAの吸着量が減り、反応率が向上していることが明白である。

本発明によるDNA試料調製方法の第二の実施例を図2図のフローチャートに示す。基本フローは第一実施例と同様で、他種DNAを注入する操作2に加えて容器壁への吸着剤として非イオン界

面活性剤であるポリオキシエチレン（20）ソルビタンモノラウレートを注入する操作12を採用したものである。

本方法による実験結果を図6図に示す。同図（b）はポリオキシエチレン（20）ソルビタンモノラウレートを注入せずに反応を行った場合のDNA断片スペクトル、図の上側はポリオキシエチレン（20）ソルビタンモノラウレートをアニール反応液中で0.1%になるよう注入したときのDNA断片スペクトルである。なおここでは、プライマーと鎖型DNAは等モル供給した。ポリオキシエチレン（20）ソルビタンモノラウレートにより容器壁への鎖型DNAの吸着量が減り、反応率は明らかに向上した。

第一実施例、第二実施例では反応液を調製した後に吸着物質を混入したが、予め蒸留水やバッファ等に該吸着物を混合しておいても同様であることは勿論である。

本発明によるDNA試料調製方法の第三の実施例を図7図のフローチャートに示す。反応液を容

器に分注・混合する操作1の前に、容器壁に吸着させ物質を容器に注入する操作13、前記溶液を懸架して乾燥させる操作14を行うものである。吸着物質としてpBB322二本鎖DNA並びにポリオキシエチレン（20）ソルビタンモノラウレートを用いたところ、

第5図、第6図の上側と同等のS/NのDNA断片スペクトルが得られた。

なお以上の方法を他のDNA試料の反応、例えば制限酵素分解反応等に適用できるのは勿論である。

#### 〔発明の効果〕

本発明では、DNA試料の容器壁への吸着を防ぐことができ、特にDNA試料量が微量になった場合の反応率を向上させることができる。

#### 4. 図面の簡単な説明

第1図、第2図、第7図は本発明の実施例の工程フローチャート、第3図は従来法の塩基配列決定プロセスにおけるDNA断片スペクトルの変化を示す測定図、第4図は第3図の傾向を反応率と

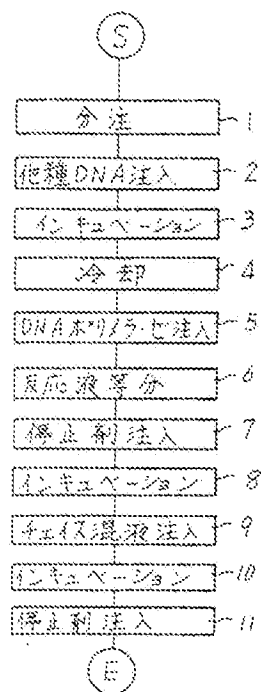
して整理したグラフ、第5図、第6図はそれぞれ本発明の実施例および従来例のDNA断片スペクトルの測定図である。

代理人 弁護士 小川 源 治

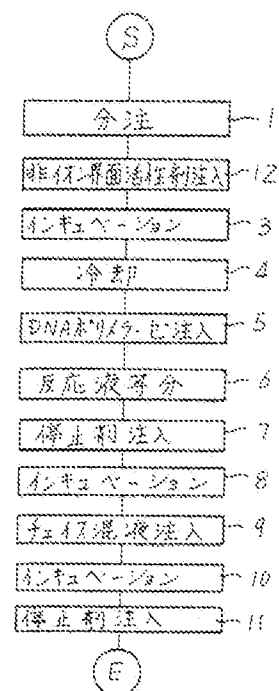




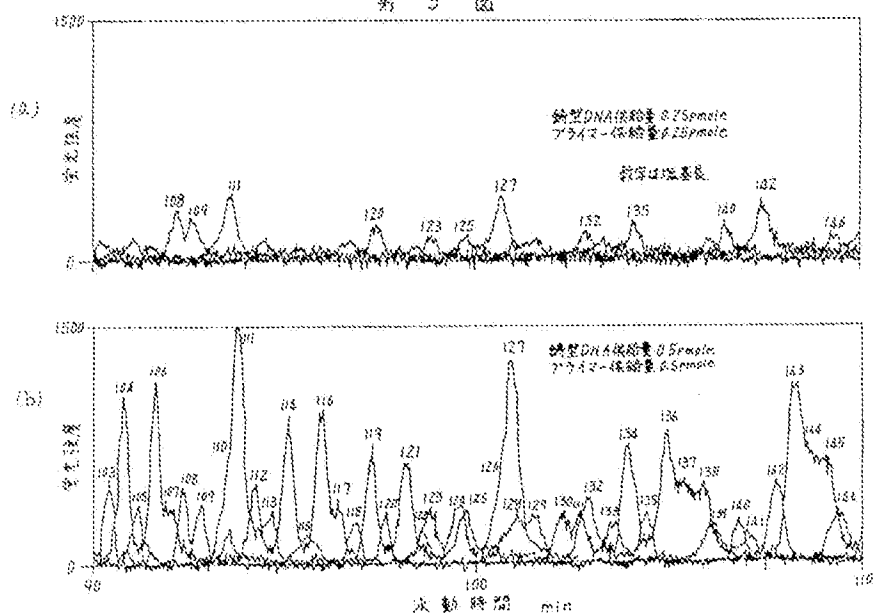
第 1 図



第 2 図

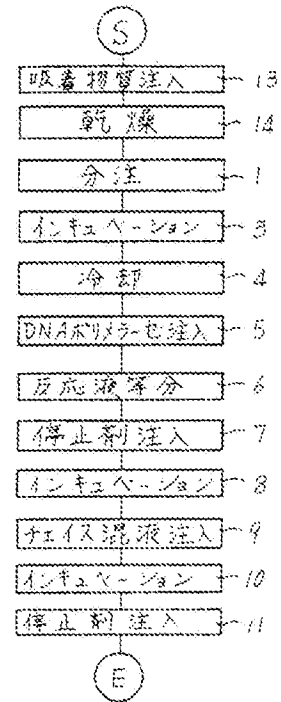
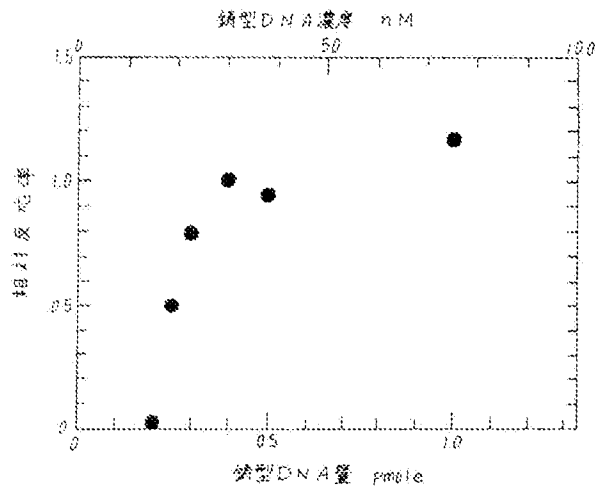


第 3 図

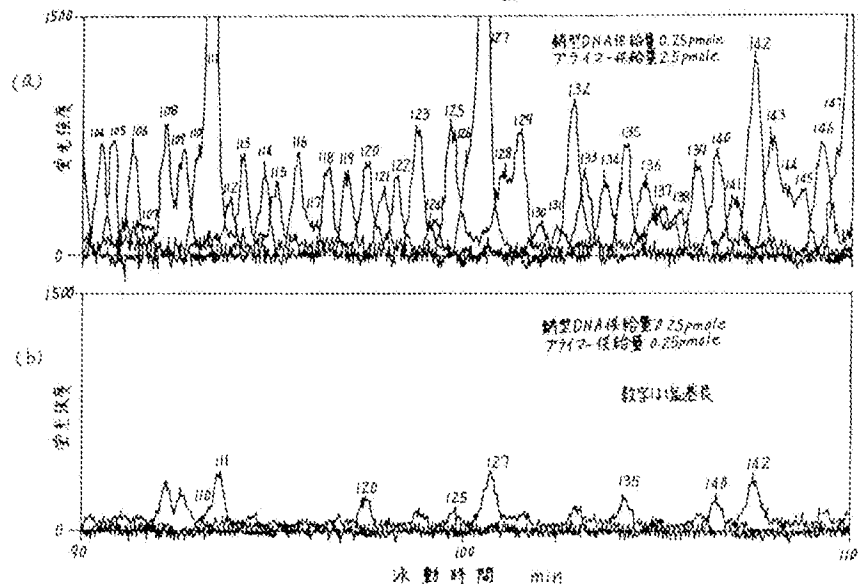


第 7 図

第 4 図



第 5 図



第 4 図

